

高温下 3 种壳色虾夷扇贝存活率、代谢率、免疫酶活力及 HSP70 表达的比较研究

郝振林, 刘京哲, 唐雪娇, 湛垚垚, 田莹, 丁君, 杨立猛, 常亚青

(大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 以 3 种壳色虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)(枫叶贝、红贝、白贝)为实验材料, 将在 15℃ 暂养的 3 种壳色虾夷扇贝分别驯化至 20, 22, 24 和 26 ℃ 4 个温度梯度(升温幅度为 1 ℃/d), 待各处理组达到对应温度梯度后暂养 7 d, 测定比较 3 种壳色虾夷扇贝的存活率、耗氧率和排氨率、抗氧化酶活力和热激蛋白 HSP70 表达等指标。结果表明: 随着温度的升高, 3 种壳色的虾夷扇贝的存活率呈先上升后下降趋势, 其中, 白壳色虾夷扇贝的存活率在同一处理组中最高; 3 种壳色的虾夷扇贝耗氧和排氨率均随温度升高呈现先升高后降低的趋势, 同一温度处理组下白壳色虾夷扇贝的代谢率始终高于红贝和枫叶贝; 另外, 总抗氧化能力(total-antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧酶(activity of superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、过氧化物酶(Peroxidase, POD) 4 种免疫酶的活性随温度升高也呈现先升高后降低的趋势, 且同一温度处理组下白壳色虾夷扇贝的免疫酶活力始终高于红贝和枫叶贝; 3 种壳色虾夷扇贝 HSP70 的表达模式基本相同, 随着温度的逐渐升高, HSP70 持续表达, 到 26℃ 时表达量最高, 且白壳色扇贝 HSP70 的相对表达量最高为 5.07。综上, 白壳色虾夷扇贝在高温应激下表现出较强的抵抗和耐受能力, 因此, 可将其作为后期耐高温型虾夷扇贝新品系的重要培育材料。

关键词: 虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*); 壳色; 高温; 免疫酶活力; 热激蛋白 70(HSP70)

中图分类号: S96 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)11-0108-08

doi: 10.11759/hyxx20150805001

颜色作为可稳定遗传性状, 已在动植物的遗传育种中进行了大量研究并得到广泛应用。在海产经济动物中, 体色常与生长指标相结合用于育种的研究中^[1]。Winkler 等^[2-3]通过对紫扇贝和海湾扇贝研究发现, 壳色与扇贝的生长情况密切相关; 刘晓^[4]等对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)红壳色突变体进行定向选育和遗传改良, 育成了“中国红”品系; 中国海洋大学包振民教授带领团队采用杂交、选育和现代分子生物学技术相结合的方法, 培育出栉孔扇贝新品种“蓬莱红”; 何毛贤^[5]等在我国马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)群体中选育出了优良品系“南科珍珠红”。

虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)为大型冷水性双壳贝类, 于 20 世纪 80 年代初由日本青森县引入我国, 现已在辽宁、山东等地进行规模化养殖, 是我国北方沿海地区重要的养殖经济贝类之一^[6]。近年来, 虾夷扇贝出现了大规模死亡现象, 特别在夏季, 死亡率明显增加, 给经营者带来巨大的经济损失^[7-8]。主要原因在于养殖所用苗种都未经过人工定向选育, 其遗传基础尚属野生型, 抗逆能力乃至品质质量未

达到良种化程度, 因此良种问题已成为制约我国虾夷扇贝养殖业稳定发展的主要“瓶颈”之一, 是虾夷扇贝养殖业中亟需解决的关键问题。本课题组经过长期选育, 培育出虾夷扇贝“象牙白”品系, 其特征是其左右壳均为白色^[9], 且在浮筏养殖中发现, 虾夷扇贝“象牙白”品系具有较高的抗逆能力, 尤其是在度夏过程中, 表现出对高温具有良好的抵抗力和耐受力。枫叶贝是本课题组以双白壳虾夷扇贝及普通的红褐色虾夷扇贝为亲贝, 通过单交和群交及相应的培育方法, 培育获得壳面具有红白花图案的虾夷扇贝新品系^[10], 红贝选用生产中使用的野生种群扇贝作为对照组。本研究以枫叶贝、红贝(对照组)和白

收稿日期: 2015-08-05; 修回日期: 2015-10-13

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201205031); 国家“948”项目(2011-G12); 国家“863”项目(2012AA10A410); 农业部北方海水增养殖重点实验室开放课题(2014-MSENC-KF-10)

作者简介: 郝振林(1980-), 男, 山东青岛人, 副教授, 博士, 主要从事水产养殖研究, 电话: 0411-84762695, E-mail: haozhenlin@dlou.edu.cn; 常亚青(1967-), 通信作者, 男, 河北邢台人, 教授, 博士, 主要从事水产养殖及育种研究, 电话: 0411-84762691, E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

贝(虾夷扇贝“象牙白”品系)3种壳色虾夷扇贝为材料,比较分析了3种壳色虾夷扇贝在高温水平下的生理代谢、酶学及热激蛋白 HSP70 的表达变化,旨在了解不同壳色虾夷扇贝对高温的耐受能力,为后期进行耐高温型虾夷扇贝新品系的培育提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

3种壳色虾夷扇贝分别为枫叶贝(F)、红贝(H)和白贝(B),壳长 48.30 mm±5.98 mm,壳高 49.10 mm±5.87 mm,壳宽 11.47 mm±3.16 mm,湿质量 14.45 g±5.02 g,软体部干质量 0.49 g±0.10 g。潮湿状态下运到大连海洋大学农业部北方海水增殖重点实验室,暂养于可控温独立循环品字形水槽内。暂养温度 15 °C±1 °C,盐度 30 左右,实验期间每天 09:00 和 18:00 投喂螺旋藻粉和鼠尾藻粉,连续充气,每天换 1/3 水量,驯养 14 d 后,挑选活力较强的健康扇贝进行实验。

1.2 材料培养与amp;处理

将在 15 °C 暂养的 3 种壳色虾夷扇贝分别驯化至 20, 22, 24 和 26 °C 4 个温度梯度(升温幅度为 1 °C/d),待各处理组达到对应温度梯度后暂养 7 d,每个温度梯度设有 3 个平行,每个平行放枫叶贝、红贝和白贝各 8 只(其中在不同温度处理组间,以 15 °C 处理组作为对照组)。每天记录扇贝死亡情况。

1.3 样品分析

1.3.1 耗氧率和排氨率测定

每个温度梯度分别取 3 种壳色贝各 1 只,采用静水密封法测其耗氧率和排氨率,连续测 3 d。将完好的 4 L 自封袋(确保严格密封)放入水槽中,灌入一定体积的海水,并放入一只虾夷扇贝,虹吸采水。虹吸前用手轻轻揉捏自封袋,使各处溶氧及氨氮保持一致,实验持续 2 h。采用(Winkler)碘量法检测水体溶解氧(DO)含量,次溴酸钠氧化法检测氨氮(NH₄-N)排泄率。根据实验前后溶解氧的浓度变化计算单位干质量耗氧率:

$$R_O = [C_0(DO) - C_t(DO)]V/Wt$$

C₀(DO)和 C_t(DO)分别为实验开始和结束时水中 DO 质量浓度(mg/L),V 为实验用水的体积(L),W 为实验贝软组织干质量(g),t 为实验持续时间(h)。

根据实验前后氨氮的浓度变化计算单位干质量氨氮排泄率:

$$R_N = [C_t(N) - C_0(N)]V/Wt$$

C₀(N)和 C_t(N)分别为实验开始和结束时实验水中氨氮浓度(μmol/L),V 为实验用水的体积(L),W 为实验贝软组织干质量(g),t 为实验持续时间(h)。

1.3.2 生理指标测定

用一次性 1 mL 注射器抽取达到各温度梯度后暂养 7 d 的虾夷扇贝闭壳肌内的血窦血液(从每个处理组的 3 个平行中,每种壳色随机取 1 只扇贝,用于抽取血液),注入冰浴的 2 mL 离心管中,4 °C 下 4 500 r/min 离心 10 min 后,取上清液保存于-80 °C 冰箱中备用。采用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质含量。总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)活性、过氧化物酶(POD)活性以及超氧化物歧化酶(SOD)活性均使用南京建成生物公司的试剂盒测定,并严格按照说明书步骤进行。

1.3.3 HSP70 的定量表达

1.3.3.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

参照动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)操作步骤分别提取处理温度为 15 °C 和 26 °C 并适应 7 d 后依然存活的不同壳色虾夷扇贝鳃的总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Implen NanoPhotometer 核酸蛋白分析仪(德国)检测其纯度和浓度,将样品保存于-80 °C 备用。用 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒(TaKaRa, 中国大连)获得单链 cDNA,反转录 PCR 体系为 20 μL,包含 4 μL 5 × PrimeScript™ buffer, 5 μL Total RNA, 2 μL Oligo dT Primer(50 μmol), 2 μL random 6 mers (100 μmol), 2 μL PrimeScript™ RT enzyme Mix I, 5 μL RNase Free ddH₂O。样品混匀后于 PCR 仪进行反转录,37 °C 15 min; 85 °C 5 s。

1.3.3.2 RT-PCR

利用 Primer 5.0 设计 HSP70 和细胞色素 b (cytochrom b, Cyt b) 的引物(表 1),检测其引物特异性和扩增效率。用以检测 HSP70 的表达量。利用 RT-PCR 研究不同壳色虾夷扇贝在高温 26 °C 暂养 7 d 后 HSP70 的表达量,所用仪器为 Applied Biosystems 7500 real-time PCR system(Life Technologies, USA),试剂盒为 SYBR Premix Ex Taq™ Kit(Tli RNaseH Plus, TaKaRa)。反应体系为 20 μL,包含 10 μL 2 × SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), 0.4 μL ROX Reference Dye, 2 μL cDNA 模板,上下游引物(10 μmol)各 0.8 μL, ddH₂O 6 μL。反应程序为 95 °C 30 s; 35 个循环的 95 °C 5 s, 58 °C 30 s; 溶解曲线阶段 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s。

表 1 实时定量引物
Tab.1 Primer of RT-PCR

引物名称	引物序列
CYTB F	ATTTCGGATT CAGGAAGTGGC
CYTB R	ATTTGGTCCAGCATGTC
HSP70 F	TCCTTGGGTATTGAGACT
HSP70 R	TGGTAAATGTTTGGGTCT

1.4 数据处理

采用 SPSS16.0 软件对实验所得数据进行单因子方差分析(One-way ANOVA)和组间多重比较分析(LSD), 不同壳色间进行独立样本 *T* 检验, 显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 实验结果

2.1 存活率

不同高温水平下 3 种壳色虾夷扇贝存活率如图 1 所示。随温度升高, 3 种壳色虾夷扇贝存活率均呈下降趋势, 其中在 15~22 °C 处理组下, 3 种壳色虾夷扇贝存活率均大于 90%, 且差异不显著($P>0.05$), 另外, 在同一温度处理组下, 3 种壳色虾夷扇贝之间的存活率差异也不显著($P>0.05$)。在 26 °C 处理组下, 枫叶贝和红贝存活率均显著降低($P<0.05$), 且在同一温度处理组下, 不同壳色虾夷扇贝的存活率也存在差异, 在 5 个温度处理组中, 3 种壳色扇贝的存活率始终为白贝>红贝>枫叶贝, 其中 26 °C 时枫叶贝的存活率最低为 67%。

2.2 耗氧率和排氨率

2.2.1 耗氧率

不同高温水平下 3 种壳色虾夷扇贝的耗氧率见图 1。随温度升高, 3 种壳色虾夷扇贝耗氧率均呈先上升后下降趋势, 除 15 °C 和 26 °C 处理组外, 各温度处理组间差异显著($P<0.05$)。其中在 15~24 °C 处理组下, 3 种壳色虾夷扇贝耗氧率随温度逐渐升高, 且在 24 °C 时达到最高, 枫叶贝为 1.53 mg/(g·h), 红贝 1.17 mg/(g·h) 和白贝 1.71 mg/(g·h); 26 °C 时, 耗氧率显著降低。另外, 在同一温度处理组中, 3 种壳色贝耗氧率也存在差异, 白贝的耗氧率始终高于红贝和枫叶贝。

2.2.2 排氨率

不同高温水平下 3 种壳色虾夷扇贝排氨率的变化趋势与耗氧率相似(图 1)。在 15~24 °C 处理组下, 随温度升高, 3 种壳色虾夷扇贝耗氧率逐渐上升, 并在 24 °C 时达到最大, 枫叶贝为 4.23 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 、红

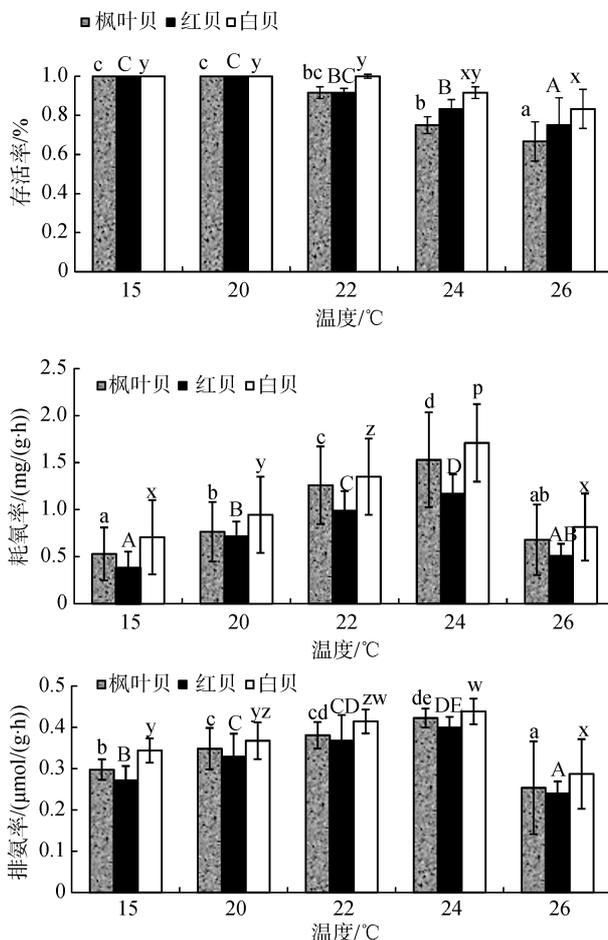


图 1 不同温度下 3 种壳色虾夷扇贝的存活率、耗氧率、排氨率

Fig.1 The survival rate, oxygen consumption rate and ammonia excretion rate for 3 kinds of shell colors *M.yessoensis* in different temperature groups

注: 不同字母表示处理组间差异显著($P<0.05$), 下同

Note: The different letters in different temperature groups mean significant differences ($P<0.05$), the same as following

贝和白贝分别为 4.00 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 和 4.39 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。26 °C 时, 3 种壳色虾夷扇贝排氨率均降至最低。另外, 在同一温度处理组下, 3 种壳色虾夷扇贝排氨率存在差异, 排列顺序为白贝>红贝>枫叶贝。

2.3 免疫酶活力

2.3.1 CAT

不同高温水平下 3 种壳色虾夷扇贝的过氧化氢酶(catalase, CAT)活力变化如图 2 所示。15~24 °C 处理组下, 随着温度的升高, 3 种壳色虾夷扇贝的 CAT 活力均呈上升趋势, 且在 24 °C 时达到最高。当温度升高到 26 °C 时, 虾夷扇贝的 CAT 活力快速下降, 显著低于其他处理组 15 °C ($P<0.05$)。另外, 在同一温度处理组下, 白贝的 CAT 活力始终高于枫叶贝和红贝。

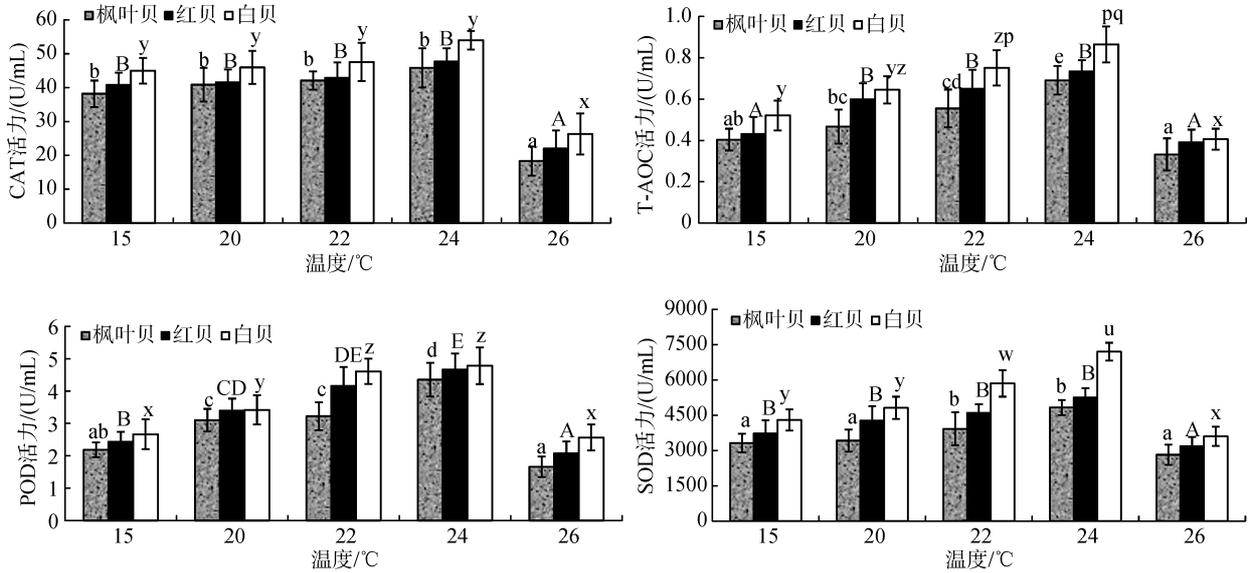


图2 不同温度下3种壳色虾夷扇贝的CAT活力、T-AOC活力、POD活力和SOD活力
Fig.2 The CAT, T-AOC, POD and SOD for 3 kinds of shell colors *M.yessoensis* in different temperature groups

2.3.2 T-AOC

不同高温活力下3种壳色虾夷扇贝的总抗氧化能力(total-antioxidant capacity, T-AOC)活力如图2所示。在不同高温下,3种壳色虾夷扇贝CAT活力的变化趋势相同,随着温度升高,虾夷扇贝的T-AOC活力呈现先上升后下降的趋势,在24 °C处理组下,T-AOC活力升至最高,分别为枫叶贝0.69 U/mL,红贝0.73 U/mL,白贝0.87 U/mL,在26 °C时降至最低:枫叶贝0.33 U/mL,红贝0.39 U/mL,白贝0.05 U/mL,且3种壳色扇贝在同一温度处理组下的T-AOC活力始终为白贝>红贝>枫叶贝。

2.3.3 POD

不同高温水平下3种壳色虾夷扇贝的过氧化物酶(oxidase, POD)活力如图2所示。随着温度升高,3种壳色虾夷扇贝的POD活力均呈先上升后下降的趋势,并在24 °C时达到最高值。26 °C处理组下,3种壳色虾夷扇贝POD活力最低分别为:枫叶贝1.66 U/mL,红贝2.07 U/mL,白贝2.57 U/mL,同一温度处理组下,白贝的POD活力始终显著高于红贝和枫叶贝。

2.3.4 SOD

不同高温水平下3种壳色虾夷扇贝的超氧化物歧化酶(activity of superoxide dismutase, SOD)活力变化如图2所示。随着温度升高,3种壳色虾夷扇贝的SOD活力均呈先上升后下降的趋势。其中枫叶贝、红贝和白贝体腔液中SOD活力均在24 °C温度处理组下最高,分别为4 825 U/mL, 5 249 U/mL, 7 199 U/mL,并在26 °C时降至最低,枫叶贝2 818 U/mL,红贝

3 175 U/mL,白贝3 600 U/mL。同一温度处理组下,3种壳色虾夷扇贝的SOD活力大小为:白贝>红贝>枫叶贝。

2.4 HSP70 的特异性表达

不同高温水平下3种壳色虾夷扇贝鳃的HSP70表达量变化如图3所示。随着温度升高,3种壳色虾夷扇贝的HSP70的表达量均逐渐升高,其中15~22 °C时,HSP70表达量差异不显著($P > 0.05$),24~26 °C温度处理组下,虾夷扇贝鳃的HSP70表达量差异也不显著($P > 0.05$)。同一温度处理组下,不同壳色虾夷扇贝HSP70表达量大小为白贝>红贝>枫叶贝($P > 0.05$)。

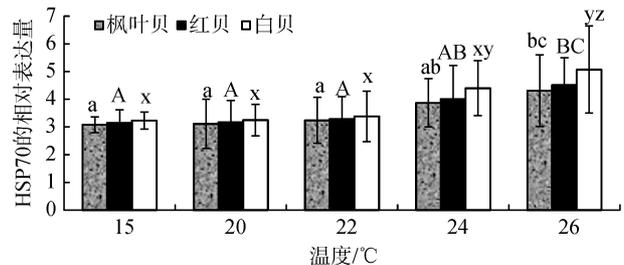


图3 不同温度下3种壳色虾夷扇贝HSP70的表达量
Fig.3 HSP70 for 3 kinds of shell colors *M.yessoensis* in different temperature groups

3 讨论

3.1 存活率

虾夷扇贝是大型冷水性双壳贝类,早期文献记载虾夷扇贝的耐温上限为23 °C,超过23 °C时虾夷

扇贝代谢活动缓慢,基本处于不摄食状态,从而导致机体消瘦,最后死亡,其中 15 °C 是虾夷扇贝最适生长温度^[11-12]。本研究结果与之相符,在 15~22 °C 处理组下,3 种壳色虾夷扇贝存活率均大于 90%,在 24~26 °C 处理组下,3 种壳色虾夷扇贝存活率均显著降低。另外,在本研究中,虾夷扇贝在 24~26 °C 处理组下的存活率较作者以前报道的此温度下虾夷扇贝的存活率略存在差异^[13-15],分析认为出现差异的原因可能与实验过程中选取的虾夷扇贝的健康状态、个体大小有关。此外,本研究还发现,白壳色虾夷扇贝在 26 °C 高温下的存活率显著高于其他壳色,这与郑怀平等报道的壳色较浅的海湾扇贝具有较强的耐高温能力的研究结果相似^[16]。Newkirk^[17]认为浅壳色贝类在高温下表现出较高的存活率可能是因为浅壳色贝类在高温季节吸收光和热较少的缘故,而关于其具体原因尚待于进一步研究。

3.2 耗氧率与排氨率

目前,耗氧率和氨氮排泄率已经被认为是评估水产动物在不同胁迫环境中利用蛋白和能量的有效指标^[18-19]。由简单能量平衡公式 $P=A-R$ (P 为生长; A 为消化吸收; R 为呼吸作用)可知,假定饵料的消化吸收与温度无关,呼吸代谢升高则生长下降,呼吸代谢降低则生长增加^[20]。而温度可能是影响虾夷扇贝代谢率最明显的环境因子^[21]。本文研究发现,虾夷扇贝的耗氧随温度升高先升高再降低,这说明虾夷扇贝在 15 °C 的环境中耗能少,更多的能量则用于生长,因此,15 °C 是虾夷扇贝最适生长温度,这与早期研究结果相一致^[11-12]。26 °C 时,虽然虾夷扇贝耗氧率也较低,但此时已超过扇贝的耐温上限,其代谢活动非常微弱,基本处于不摄食状态,因此耗氧率虽然低,但生长缓慢。另外,虾夷扇贝的排氨率随温度升高表现为先增加后下降的趋势。这说明在适宜温度下,温度升高能够加速蛋白和氨基酸的分解代谢,因此导致氨氮排泄升高。这与双壳滤食性贝类中的墨西哥湾扇贝^[22]、栉孔扇贝^[23]和硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)^[24]随温度的变化情况相似。另外,本研究还发现,在同一高温处理下,白壳色虾夷扇贝的耗氧率和排氨率数值较其他两种壳色的虾夷扇贝偏高。同样,王庆恒^[25]在马氏珠母贝得到相似的研究结果,他发现,在高温下,黄壳色品马氏珠母贝的耗氧率和排氨率均大于其他壳色系,这表明浅壳色贝类在高温下表现出较强的

高温耐受性。

3.3 免疫酶活力

当生物体遇到外界不良环境刺激时,会导致机体内活性氧自由基积聚过多,进而造成细胞膜的损坏,影响细胞正常功能的发挥^[26]。在长期的进化过程中,生物体内形成了一套能够及时有效清除活性氧自由基的反应机制,使其生成与清除始终处于动态平衡^[26]。SOD 和 CAT 就是这个清除体系中的重要成员^[26-28]。SOD 可将生物体内产生的活性氧转化为 H_2O_2 ,并由 CAT 分解成 H_2O 和 O_2 ^[29]。POD 一般在衰老组织中可检测出较高的活性,检测生物体内 POD 的活力变化能比较准确地反映机体的免疫力^[30]。而 T-AOC 活力的高低能够反应机体抗氧化系统对外界刺激的总应激能力^[31]。

高温对动物的伤害途径之一是氧化胁迫^[32]。胁迫初期,扇贝体内的活性氧清除系统被激活,因此在本研究中,15~24 °C 处理组时,T-AOC、SOD、CAT 和 POD 四者的活性均不断升高并在 24 °C 时达到最高,随着胁迫温度的升高,各种抗氧化酶活性开始降低,扇贝存活率也显著降低,这与 26 °C 时的低存活率研究结果相吻合。另外,在同一高温处理组下,白壳色虾夷扇贝较其他两种壳色具有较高的免疫酶活力,这说明白壳色虾夷扇贝在高温下表现出较强的耐受性。此外,闫喜武等^[33]在对菲律宾蛤仔进行研究时也发现,高温下壳色较浅的斑马蛤品系比壳色较深的两道红品系具有较高的存活率和较强的抗逆性,这与本研究结果相似。

3.4 HSP70 在温度胁迫下的表达

热休克蛋白作为分子伴侣可以帮助变性蛋白重新复性和新合成蛋白的折叠,是高度保守的家族,另外还参与蛋白分泌、降解等过程^[34]。而 HSP70 作为已知热休克蛋白家族中最重要的一种,对于维持细胞内稳态,缓解机体所受到的应激损伤有重要作用,生物受到热胁迫时,其在细胞内的大量表达和积累可以明显改善细胞的生存能力,提高对环境胁迫或伤害的耐受性^[35]。

Snyder^[34]等发现,暴露于高热和化学药品超标的水体中的紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和红鲍螺(*Haliotis rufescens*),其体内的 HSP70、HSP60 和 HSP90 含量均发生显著变化。从生活习性看,贝类是滤食性生物,其伸展于水体中的鳃片鳃丝富含触觉细胞,比其它组织能更直接地感应到环境中水流、温

度、重金属离子浓度等的变化,并迅速做出应答。曲凌云等^[36]通过热刺激栉孔扇贝,对 HSP70 表达跟踪检测结果显示,受高温刺激后,扇贝鳃中的 HSP70 表达量明显升高。洪美玲^[37]等在探讨中华绒螯蟹在亚硝酸盐急性胁迫过程中的应对策略时发现,水中亚硝酸盐浓度越高,HSP70 最大表达量越大,进而预测 HSP70 表达量的变化可作为一种较为敏感的早期应激评价指标应用于亚硝酸盐胁迫评价中。本研究在高温处理后对不同壳色虾夷扇贝鳃 HSP70 进行定量表达研究时发现,白壳色虾夷扇贝的相对表达量显著高于其他两种壳色虾夷扇贝。由此我们推断,在受到高温胁迫时,与其他壳色的虾夷扇贝相比,白壳色虾夷扇贝体内的 HSP70 会更多地表达和积累,从而使其对高温具有更好的耐受性。

参考文献:

- [1] Wade N, Goulter K C, Wilson K J, et al. Esterified astaxanthin levels in lobster epithelia correlate with shell colour intensity: Potential role in crustacean shell colour formation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B*, 2005, 141: 307-313.
- [2] Winkler F M, Estevez B F, Jollgm L B, et al. Inheritance of the general shell color in the scallop *Argopecten puratus* (Bivalvia: Pectinidae) [J]. *Molecular Biology*, 2011, 92(6): 521-525.
- [3] Elek J A, Adamkewicz S L. Polymorphism for shell color in the Atlantic bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck) Mollusca: Bivalvia on Martha's Vineyard Island[J]. *American Malacological Bulletin*, 1990, 7(2): 117-126.
- [4] 刘晓, 张国范, 赵洪恩. 皱纹盘鲍“中国红”品系的选育[J]. *动物学杂志*, 2003, 38(4): 27-35.
- [5] 何毛贤. 马氏珠母贝红壳品系“南科珍珠红”的培育[J]. *热带海洋学报*, 2006, 25(1): 58.
- [6] 常亚青. 贝类增殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [7] 徐东, 张继红, 王文琪, 等. 温度变化对虾夷扇贝耗氧率和排氮率的影响[J]. *中国水产科学*, 2010, 9: 1101-1106.
- [8] 丁君, 常亚青, 张婧, 等. 虾夷扇贝“象牙白”品系与普通品系营养成分分析与评价[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(2): 121-128.
- [9] 丁君, 常亚青, 曹学彬, 等. 双白壳虾夷扇贝的培养方法[P]. 中国发明专利: CN101103709A. 2008-01-16.
- [10] 常亚青, 丁君, 商国良, 等. 红白花虾夷扇贝的培育方法[P]. 中国专利: CN102630612A, 2012-08-15.
- [11] 王如才, 王召萍, 张建忠. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1993: 155-204.
- [12] 李文姬, 谭克非. 日本解决虾夷扇贝大规模死亡的启示[J]. *水产科学*, 2009, 28(10): 609-612.
- [13] 郝振林, 丁君, 賁月, 等. 高温对虾夷扇贝存活、耗氧和排氮的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2013, 28(2): 138-142.
- [14] 郝振林, 唐雪娇, 丁君, 等. 不同高温水平对虾夷扇贝存活率、耗氧率免疫酶活力的影响[J]. *生态学杂志*, 2014, 33(6): 1580-1586.
- [15] Hao Zhenlin, Tang Xuejiao, Ding Jun, et al. Effect of high temperature on survival, oxygen consumption, behavior, ammonia-N excretion, and related immune indicators of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22: 1863-1876.
- [16] 郑怀平, 张国范, 刘晓, 等. 不同贝壳颜色海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 家系的建立及生长发育研究[J]. *海洋与湖沼*, 2003, 34(6): 632-639.
- [17] Newkirk G F. Genetics of shell color in *Mytilus edulis* and the action of growth rate with shell color[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1980, 46(1): 89-94.
- [18] Chen J C, Chia P G. Effects of unilateral eyestalk ablation on oxygen consumption and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* Bate at different salinity levels[J]. *J Crustacean Biol*, 1995, 15: 434-443.
- [19] Chen J C, Chen K W. Oxygen uptake and ammonia-N excretion of juvenile *Penaeus japonicus* during depuration following one-day exposure to different concentrations of saponin at different salinity levels[J]. *Aquaculture*, 1997, 156: 77-83.
- [20] Dalla V G J. Salinity responses of the juvenile penaeid shrimp *Penaeus japonicus*. I. Oxygen consumption and estimations of productivity[J]. *Aquaculture*, 1986, 55: 297-306.
- [21] Dall W, Hill B J, Rothlisberg P C. The Biology of the

- Penaecidae[C]//Blaxter J H S , Southward A J . Advances in Marine Biology (vol. 27). New York : Academic Press, 1990: 17-340.
- [22] Mayzaud P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton: II Studies of the metabolic characteristics of starved animals[J] . Mar Biol, 1973, 21: 19-28 .
- [23] 袁有宪, 陈聚法, 曲克明. 栉孔扇贝对环境变化适应性研究-温度对存活、呼吸、摄食及消化的影响[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 24-27 .
- [24] 柴雪良, 方军, 林志华. 温度对美国硬壳蛤滤食率、耗氧率和排氨率的影响[J] . 海洋科学, 2005, 29(8) : 33-36 .
- [25] 王庆恒, 张善发, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝黄壳色选系 F1 与对照组耗氧率和排氨率的比较[J]. 水产学报, 2009, 33(5): 790-796.
- [26] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 259-265.
- [27] Fearman J, Moltschaniwskyj N A. Warmer temperatures reduce rates of gametogenesis in temperate mussels, *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquaculture, 2010, 305: 20-25.
- [28] 王妤, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对点篮子鱼的存活、生长抗氧化防御系统的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(1): 66-73.
- [29] Fridovich L. Superoxide radical and superoxide dismutases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64: 97-112.
- [30] Wilbur A E, Hilbish T J. 1989. Physiological energetics of the ribbed mussel *Geukensia demissa* (Dillwyn) in response to increased temperature[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 131: 161-170.
- [31] 胡俊茹, 王安利, 曹俊明. 维生素 E 和硒互作对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗氧化系统的调节作用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 68-74.
- [32] Zou J, Liu C, Chen X. Proteomics of rice in response to heat stress and advances in genetic engineering for heat tolerance in rice[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30: 2155-2165.
- [33] 闫喜武, 张国范, 杨凤, 等. 菲律宾蛤仔莆田群体两个壳色品系生长发育的比较[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(4): 266-269.
- [34] Snyder M J, Girvetz E, Mulder E P. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress[J]. Arch Environ Contam Toxicol. 2001, 41 (1): 22.
- [35] Tedengren M, Olsson B, Reimer O, et al. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP70 levels in Baltic Sea mussels[J]. Aquatic Toxicol, 1999, 48: 1-12.
- [36] 曲凌云, 相建海, 孙修勤, 等. 温度刺激下栉孔扇贝不同组织热休克蛋白 HSP70 的表达研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(5): 96-100.
- [37] 洪美玲, 陈立侨, 孙新谨, 等. 亚硝酸盐急性胁迫对中华绒螯蟹幼体相关免疫指标和应激蛋白(HSP70)表达的影响[J]. 应用于环境生物学报, 2011, 17(5): 688-693.

A comparative study of survival, metabolism, immune indicators and HSP70 expression in three kinds of shell colors Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* under high temperature stress

HAO Zhen-lin, LIU Jing-zhe, TANG Xue-jiao, ZHAN Yao-yao, TIAN Ying, DING Jun, YANG Li-meng, CHANG Ya-qing

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China's Sea, Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Received: Aug., 5, 2015

Key words: *Mizuhopecten yessoensis*; shell color; high temperature; immune indicators; HSP70

Abstract: Three shell colors of *Mizuhopecten yessoensis* were used to test the survival rate, oxygen consumption rate, ammonia-N excretion rate, catalase (CAT) and activity of superoxide dismutase (SOD) activities, total-antioxidant capacity (T-AOC), peroxidase (POD) contents, and HSP70 under short-term high temperature. The scallops reared in 15°C were acclimatized to the different temperature levels 20, 22, 24 and 26°C (temperature increased 1°C per day), and then maintained for 7 days. The results showed that the survival rates of the 3 shell colors *M. yessoensis* showed a increase among 15~24°C temperature treatments with the increase of temperature, and then decrease followed. The survival rates of white shell colors *M. yessoensis* were higher than the two other shell colors in each temperature treatment. The oxygen consumption rates and ammonia-N excretion rates in 3 shell colors *M. yessoensis* exhibited the similar changes with the survival rates. In addition, four kinds of immune enzyme activity (T- AOC, SOD, CAT and POD) also showed a similar changes with the survival rates(a firstly increase, and then decrease followed). And these 4 kinds of immune enzyme activity in white shell colors *M. yessoensis* were higher than the two other shell colors in each temperature treatment. The HSP70 expression in three shell colors *M. yessoensis* continued to express when the temperature increased, and the highest value occurred in 26°C. The white shell colors scallop showed the higher relative quantity of HSP 70 expression (5.07) compared with the other two shell colors scallops. Finally, we get the conclusion that white shell colors scallop has a strong ability of resistance to high temperature, and it could be a very good alternative materials in breeding *M. yessoensis* new strains with strong high temperature resistant in the future.

(本文编辑: 刘珊珊)